

BAB III

METODE PENELITIAN

3.1 Waktu dan Tempat Pelaksanaan

Penelitian dilaksanakan di Laboratorium Mitra Anggrek Indonesia (MAI), Jalan Hasanuddin, Junrejo, Batu. Pelaksanaan penelitian ini dimulai bulan Juli – September 2018.

3.2 Alat dan Bahan

Alat yang digunakan yakni *Laminair Air Flow* (LAF), autoclave, timbangan digital, glassware, erlenmeyer, cawan petri, gelas ukur, pinset, scalpel and blade, gunting, botol kultur, kertas pH indikator, rak kultur, pengatur suhu ruang.

Bahan yang digunakan antara lain: media dasar MS (*Murashige and Skoog*); biji Mentigi; zat pengatur tumbuh auksin 2,4D; sitokinin berupa BAP; clorox 1%; alkohol 70%, alkohol 96%, aquades steril.

3.3 Metode Penelitian

Rancangan yang digunakan pada penelitian disusun secara Rancangan Acak Lengkap (RAL) dengan menggunakan 2 faktor. Faktor pertama yaitu konsentrasi larutan 2,4 D (A) dengan 3 taraf konsentrasi yaitu = A1: penambahan konsentrasi 2,4 D 1,0 ppm; A2 : penambahan konsentrasi 2,4 D 2,0 ppm; A3: penambahan konsentrasi 2,4 D 3,0 ppm. Faktor kedua yaitu konsentrasi larutan BAP (B) dengan 3 taraf konsentrasi yaitu = B1: penambahan konsentrasi BAP 1,0 ppm; B2 : penambahan konsentrasi BAP 2,0 ppm; B3: penambahan konsentrasi BAP 3,0 ppm. Semua kombinasi perlakuan diulang sebanyak 3 kali. Kombinasi perlakuan disajikan pada Tabel 3.1

Tabel 3.1 Tabel Kombinasi Perlakuan

	B1	B2	B3
A1	A1B1	A1B2	A1B3
A2	A2B1	A2B2	A2B3
A3	A3B1	A3B2	A3B3

Keterangan :

A1B1 : 2,4 D 1,0 ppm + BAP 1,0 ppm

A2B1 : 2,4 D 2,0 ppm + BAP 1,0 ppm

A3B1 : 2,4 D 3,0 ppm + BAP 1,0 ppm

A1B2 : 2,4 D 1,0 ppm + BAP 2,0 ppm

A2B2 : 2,4 D 2,0 ppm + BAP 2,0 ppm

A3B2 : 2,4 D 3,0 ppm + BAP 2,0 ppm

A1B3 : 2,4 D 1,0 ppm + BAP 3,0 ppm

A2B3 : 2,4 D 2,0 ppm + BAP 3,0 ppm

A3B3 : 2,4 D 3,0 ppm + BAP 3,0 ppm

3.4 Langkah – Langkah Penelitian

3.4.1 Pembuatan Larutan Stok Hormon dan Pembuatan Media

3.4.1.1 Pembuatan Larutan Stok Hormon

Pembuatan stok 2,4 D yakni dengan menimbang 2,4 D sebanyak 20 mg lalu ditambahkan dengan alkohol hingga larut, kemudian ditambahkan 20 ml aquadest.

Sedangkan pembuatan stok BAP yakni dengan menimbang 0,4505 gr lalu ditambahkan dengan HCl hingga larut, kemudian ditambahkan 50 ml aquadest.

3.4.1.2 Pembuatan Media

Media yang digunakan adalah media MS yang mengandung hara dan mikro (Lampiran 1 Tabel 1). Pembuatan 1 L media MS dilakukan dengan langkah-langkah berikut :

- Stok hara, stok mikro dan vitamin dimasukkan pada wadah kemudian dilarutkan dengan aquadest hingga mencapai volume 1 L
- ZPT ditambahkan pada wadah, yakni 2,4 D dan BAP
- Sukrosa 30 mg ditambahkan pada larutan
- Kemudian larutan di cek pH nya hingga mencapai Ph 5,8. Bila pH terlalu tinggi diturunkan dengan penambahan beberapa tetes HCL. Apabila terlalu rendah dapat ditambahkan dengan dengan beberapa tetes KOH
- Setelah itu agar-agar swallow 7 gr dimasukkan pada larutan
- Larutan lalu dimasak hingga mendidih kemudian dimasukkan pada botol-botol kultur
- Selanjutnya botol kultur tersebut dimasukkan dalam autoclave untuk sterilisasi pada suhu 121° selama 15 menit.

3.4.2 Sterilisasi, Isolasi dan Penanaman Eksplan

Bahan tanaman yang digunakan yaitu biji *Vaccinium varingiaefolium*. Sterilisasi dilakukan dengan 2 tahapan yaitu tahap di luar LAF dan di dalam LAF. Sterilisasi di luar LAF (*Laminair Air Flow*) dilaksanakan dengan mencuci buah menggunakan sabun pencuci piring dan dibilas pada air mengalir. Kemudian sterilisasi di dalam LAF yakni buah dimasukkan pada larutan fungisida (dithane) 4 gr/100 ml selama 30 menit lalu membilasnya dengan aquadest steril sampai sisa fungisida hilang. Setelah itu buah dimasukkan pada larutan bakterisida (agrept) 4

gr/100 ml selama 30 menit lalu bilas dengan aquadest steril sampai sisa bakterisida hilang. Langkah selanjutnya yakni merendam buah pada alkohol 70 % selama 5 menit lalu membilasnya dengan aquadest steril sampai sisa alkohol hilang. Penanaman eksplan dilakukan dengan mengambil buah menggunakan pinset kemudian buah ditekan hingga pecah, kemudian biji yang terdapat dalam buah siap ditanam pada media yang telah dibuat.

3.5 Peubah Yang Diamati

Pengamatan dilakukan mulai satu hari setelah tanam (HST) setiap 8 hari sekali selama 48 hari. Peubah yang diamati yaitu :

- a. Persentase eksplan pecah menunjukkan eksplan yang pecah

$$\frac{\text{Jumlah eksplan pecah setiap perlakuan}}{\text{Jumlah seluruh eksplan yang ditanam setiap perlakuan}} \times 100$$

- b. Persentase eksplan berkalus menunjukkan eksplan yang berkalus

$$\frac{\text{Jumlah eksplan berkalus}}{\text{Jumlah seluruh eksplan yang ditanam setiap perlakuan}} \times 100\%$$

- c. Persentase pencoklatan menunjukkan eksplan yang warnanya berubah menjadi coklat

$$\frac{\text{Jumlah pencoklatan}}{\text{Jumlah seluruh eksplan yang ditanam setiap perlakuan}} \times 100\%$$

- d. Persentase eksplan mati menunjukkan kalus yang muncul namun pada akhir pengamatan tidak adanya perkembangan

$$\frac{\text{Jumlah eksplan mati}}{\text{Jumlah seluruh eksplan yang ditanam setiap perlakuan}} \times 100\%$$

e. Persentase kontaminasi yakni jamur yang muncul pada eksplan atau media

$$\frac{\text{Jumlah kontam}}{\text{Jumlah seluruh eksplan yang ditanam setiap perlakuan}} \times 100$$

3.6 Analisis Data

Data hasil penelitian yang diperoleh dianalisis secara deskriptif dan rancangan percobaan yang digunakan adalah rancangan acak lengkap (RAL) dua faktor yaitu pemberian 2,4 D yang dikombinasikan dengan BAP. Jumlah ulangan dalam setiap perlakuan adalah 3 kali ulangan dan setiap ulangan terdiri dari 5 botol kultur, 1 botol kultur berisi 2 eksplan.

Data peubah yang diperoleh dari hasil pengamatan dianalisis dengan menggunakan analisis ragam (ANOVA), apabila berpengaruh nyata akan dilanjutkan dengan uji Duncan 5% (Sarwono,2008).